

Patent No.: CN 93105862.7

Publication No.: CN 1056315C

Title: Poly I:C Compound Immunologic Adjuvant and Vaccine Containing the Adjuvant

Inventor: Haixiang, Lin

Application Date: 05-31-1993

Publication Date: 09-13-2000

Abstract

The present invention relates to immunologic adjuvant or re-enforcer, i.e. poly I:C containing kanamycin and calcium ions (PICCKCa), and especially the application of vaccines containing PICCKCa for viral infections of humans or mammals.

Invention Description

This invention relates to a new immune adjuvant and the vaccine containing this adjuvant, especially the PIC compound immune adjuvant and its applications.

The immune adjuvant is an agent that can improve the immunogenicity. This agent enhance nearly all the T-cell mediated immune response to antigens thus the adjuvant's immunity is not specific to adjuvant immunity, the adjuvant also can be called as immunity intensifier, it can improve antigenic immunity as well as to improve the resistance ability to the bacteria, epiphyte, virus, parasite infection and cancer.

It's well known that a vaccine is the most powerful weapon to help our body fight viruses. In present vaccine technology, due to the ineffective immunity results of the products from genetic engineering, subunit vaccine and some tiny particle inactivated whole virus, adjuvant are usually used. Presently, the alum adjuvant is the only immune adjuvant approval to be used internationally in humans. The disadvantage of alum adjuvant is that it can't stimulate the body to produce cell immunity, and it also

doesn't work with some antigens to produce humoral immunity etc. thus it is far from satisfactory for the actual requirements of an adjuvant.

To overcome the disadvantages, the purpose of this invention is to provide a new adjuvant and vaccine contains this adjuvant. This new adjuvant is stable and safe, it can; induce the production of interferon IL-2 to restrain in virus replication, improve vaccine potency and improve the production of IgM, IgG and neutralized antibody.

This invention relates to the application of Poly I:C containing Kanamycin and Calcium as the immunologic adjuvant. The short form of Poly I:C containing Kanamycin and Calcium is written as PICKCa at the following text.

In early 70s, it was found that double strand Poly I:C has excellent ability to induce the production of interferon, after that its derivative Poly I:C containing poly L-Lys and Carboxymethylcellulose, PICLC was also discovered. But Poly I:C can't be used in primates as well as human beings. PICLC is toxic to be applied to the human body. So the search continued and finally found PICKCa as a drug used for treatment of some kind virus infection. The professionals in this area all know that infection and development of a disease are two different concepts. The discovery of PICKCa is used after virus infected and after confirmed diagnosis of virus diseases. The cure result of PICKCa is also not very satisfactory. Especially it should be pointed out that there are no research reports on the use of this known medicine as the immunologic adjuvant.

The dose of PICKCa is known, thus usually 1~2mg of PICKCa can be added to each vaccine, immune injections should be provided depending on the different types of vaccines. So this invention will not provide further explanations for its dose.

The benefits of this invention related adjuvant PICKCa are:

1. PICKCa combined with viral antigen or inactivated vaccine can increase the antigen or vaccine's immune effect, such as having obvious immuno-adjuvant effect.
2. PICKCa has already been applied on human bodies, so it is easily accepted and it

may replace the current aluminum adjuvant and has its own potential advantages as a new adjuvant.

3. PICKCa has distinctive anti-virus effects when used alone at the incubation period of infection.
4. PICKCa combined with viral antigen or inactivated vaccine can be used to treat viral disease better than when used alone.

Due to the non specific immune property of adjuvants, PICKCa will play a very important role in the treatment of virus, bacteria and parasite infection as well as anti-cancer, especially will have obvious immune adjuvant effects to the various vaccine. This article relates to the vaccine including human rabies vaccine, epidemic hamorragic fever vaccine, but not limited to these.

Figure instructions:

Fig.1. Detection of interferon induced by PICKCa.

Fig.2. Detection of interleukin 2 induced by PICKCa.

Fig.3. Detection of IgG and neutralizing antibody in mice induced by PICKCa.

Fig.4. PICKCa decreases the death rate of infected rabid mice.

Fig.5 Results in detection of IgM, IgG neutralized antibody in serum samples derived at different times from immunized OFI mice with combination of PICKCa and rabies viral antigen.

Fig.6, Fig.7 Results of PICKCa promotes vaccine effects

Fig.8 Explanation of PICKCa combined with rabies antigen further reduce the death rate of infected mice.

Fig.9 Determine the safety after the combination of PICKCa and vaccine

Fig.10 Shows PICKCa promotes the production of antibody by epidemic hemorrhagic fever inactivated vaccine

To understanding this invention better, the following experiment examples will help to explain more details. These examples are not restricted only in the area, but just for better understanding of this invention.

Experiment 1

PICKCa induces interferon

20 mice a group, each receives 0.05~0.1mg of PICKCa per injection. Separate their serum at different times. By control the pathological changes of VSV virus in L929 cells, then can test the presence of serum interferon. For the test method, please refer Mossman T. Rapid Colormetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation And Cytotoxicity Assay, J. Immunol Meth.1983,65:55-63

The experiment results are shown in Table 1

The experiment results indicate that PICKCa can induce a high concentration of interferon, and can reach the pinnacle while 2 hours after the injection.

Experiment 2

PICKCa induces interleukin 2 and the test

C3H mice, receive antigen, which is inactivated purified rabies virus (IPRV) and PICKCa adjuvant. Each should receive 0.1ml for celiac injection. Test IF-2 from the mice spleens use ^{3}H tag CTLL cell verifying method. For the method, please refer Joffet M. L., etal, Appraisal of Rabies Vaccine Potency by Determination of in vitro, Specific interleukin-2 Production, Biological, 1991, 19(2): 113-123.

The experiment results are shown in Table 2. It indicates that PICKCa can increase the IL-2, non-novel.

Experiment 3

A/J mice infected by live rabies virus RD 9147, inject PICKCa, using the ELISA method (Perrin P. T. Techniques for the Preparation of Rabies Conjugates in Laboratory Techniques in Rabies (4th, edition) WHO) or RFFIT method (Smith J. A Rapid Reproducible Test for Determining Rabies Neutralizing Antibody, Bull Wld Hlth Org 1973, 48:535-541) to test conc. in IgG and neutralizing antibody of rabies virus in the mice. 0.1ml rabies virus in each mouse, each receives 0.05ml PICKCa respectively after 5 hours, 3 days and 7 days, and test the IgG and neutralizing antibody respectively. The results are shown in Table 3.

The results indicate that IgG and neutralizing antibody in RD9147 infected mice will be greatly decreased after received PICKCa. PICKCa controlled the growth of the virus evidently thus the virus can't stimulate the body to produce the antibodies.

Experiment 4

PICKCa reduces death rate of rabies virus infected mice

40 OF1 mice into 4 groups, 10 mice per group, each infected by rabies virus RD4077 0.1 ml. Then receives 0.05ml PICKCa after 6 hours, 3 days, 7 days 14 days and 18 days respectively, observe the death rate. The results are shown in Table 4.

The results indicate that PICKCa will reduce the death rate of the mice during the delitescence of rabies virus

Experiment 5

Safety test for integration between PICKCa and rabies virus vaccine

Add PICKCa respectively into 2 groups of rabies virus vaccine, brain and celiac injection, observe the death rate.

Results show it's safe. Experiment method is from China Codex, acute toxicity test.

Experiment 1

46 OF1 mice into 4 groups stochastically. This experiment is to produce vaccine from the integration between PICKCa and rabies virus antigen then inject into the mice, comparing with this antigen group, antigen with alum adjuvant group and non-adjuvant group. Test mice serum samples at different times for the IgM, IgG and neutralising antibody, the results are shown in Table 5.

The test method of IgG and neutralising antibody is the same as in the experiment 3, to test IgM use ELISA method.

The results indicate that antigen + PICKCa group can stimulate the body to produce IgM, IgG and especially the neutralising antibody more and ahead of time. Alum adjuvant will delay the antibody production, so use PICKCa as the adjuvant, the effect will be much better than use AL2O3 adjuvant.

Experiment 2, 3

PICKCa promotes effectiveness of the vaccine

As Table 6 shows, use NIH method WHO laboratory Techniques in Rabies (3rd edition) 1973, PICKCa can reduce the use of ED50 to 5-10 times, but alum adjuvant only can reduce to 1-2 times.

As Table 7 shows, use NIH method to test the effect of PICKCa for human anti-rabies virus vaccine. Results show that PICKCa can improve the effect of human anti-rabies virus vaccine observably (international unit), and increase the effectiveness of the vaccine to 2.5 international units above standard level.

Experiment 4

PICKCa integrates with rabies virus antigen and injected to the mice, can reduce the death rate of the mice that have rabies.

The purpose of this experiment is to observe the protect effect to the RD9147 infected mice through PICKCa or AL2O3 integrated with IPRV.

As Table 8 indicates that PICKCa integrated with anti-rabies virus vaccine can reduce the death rate of the mice greater than if using only PICKCa, if only use inactivated vaccine will receive tiny effect, and no effect at all if add alum adjuvant.

Experiment 5

PICKCa promotes the production of epidemic hemorrhagic fever inactivated vaccine. This experiment compares with Al(OH)3, PICKCa mixed with epidemic hemorrhagic inactivated vaccine, rabbits receive injection for 1ml each weekly, test the blood samples at day 14 and day 21, test the production of the antigen using ELISA and RPHI methods.

The results are shown in Table 10. It indicates that PICKCa improves the effectiveness of anti-epidemic hemorrhagic fever inactivated vaccine to 4-8 times and RPHI antigen to 2 times, alum adjuvant can only improve for 0~4 times, and reduces RPHI antigen.

Claim

1. Application of poly I:C contains Kanamycin and Calcium in preparation of immune adjuvant.
2. A vaccine contains adjuvant, its characteristic is: the mentioned adjuvant is the poly I:C contains Kanamycin and Calcium.
3. Immune adjuvant of Poly I:C contains Kanamycin and Calcium in produce therapeutic vaccine used to mammal and human.

[12]发明 专利 说 明 书

[21] ZL 专利号 93105862.7

[45]授权公告日 2000 年 9 月 13 日

[11]授权公告号 CN 1056315C

[22]申请日 1993.5.31 [24]颁发日 2000.7.7

[21]申请号 93105862.7

[73]专利权人 林海祥

地址 100071 北京市丰台方庄芳星园三区 31 楼
1-203 号

[72]发明人 林海祥

[56]参考文献

ARCH VIROL. 131 (3 - 4) 1993. 1. 1 A NEW
IMAWHOSTIMNLATONG. COMPLEX (PICKCA)
INEXPERIMENT RABIES:ANTIVIRAL G AD药物分析杂志 13(4) 1993. 1. 1 用 PEG 法测定
PICKCA 和 PI. PC 分子量的研究

审查员 魏春宝

[74]专利代理机构 永新专利商标代理有限公司
代理人 程伟

权利要求书 1 页 说明书 9 页 附图页数 0 页

[54]发明名称 聚肌胞复合物免疫佐剂及含有该佐剂的疫苗

[57]摘要

本发明涉及一种含卡那霉素和钙离子的聚肌胞 (PICKCa) 作为免疫佐剂 或增强剂的应用, 特别是涉及含 PICKCa 的疫苗用于预防和治疗, 以及将 PICKCa 应用于哺乳动物或人的病毒感染期。

ISSN 1008-4274

权 利 要 求 书

- 1、含卡那霉素和钙离子的聚肌胞在制备免疫佐剂中的应用。
- 2、一种含有佐剂的疫苗，其特征在于：所述的佐剂是含卡那霉素和钙离子的聚肌胞。
- 3、含卡那霉素和钙离子的聚肌胞的免疫佐剂在制备用于哺乳动物或人的治疗性疫苗中的应用。

说 明 书

聚肌胞复合物免疫佐剂及含有该佐剂的疫苗

本发明涉及一种新的免疫佐剂及含有该佐剂的疫苗，特别是涉及一种聚肌胞复合物免疫佐剂及其应用。

免疫佐剂是一种能提高抗原免疫反应的因子。由于这种因子的作用是加强几乎所有T细胞依赖性抗原的免疫反应，所以免疫佐剂的作用是非特异性的。免疫佐剂又称免疫增强剂，除了能提高抗原的免疫效果外，也用于非特异地提高机体抗细菌、真菌、病毒、寄生虫感染和肿瘤的能力。

众所周知，疫苗是人类防治病毒病最有力的武器。在现有技术中，由于各种遗传工程疫苗，合成多肽，亚单位疫苗以及一些小颗粒的全病毒灭活疫苗的免疫效果不好，通常都须用佐剂。目前国际上批准的人用佐剂只有铝佐剂。铝佐剂的缺点是不能刺激机体产生细胞免疫，也不能促进某些抗原的体液免疫，以及其它一些弊病，因而远远满足不了实际需要(Anthony D. Chinnah, et al; Vaccine, Vol.10, Issue 8, 1992, 551)。

为了克服现有技术的不足，本发明的目的在于提供一种新型的佐剂以及含有该佐剂的疫苗。这种新型佐剂安全稳定，能诱生干扰素，白细胞介素-II，并抑制病毒繁殖，提高疫苗的效价，显著提高机体 IgM, IgG 和中和抗体的产生。

本发明涉及含卡那霉素和钙离子的聚肌胞(Polyriboinosinic-Polyribocytididylic acid (PIC) containing Kanamycin and Calcium) 作为免疫佐剂的应用。本文中以下将所述的含卡那霉素和钙离子的聚肌胞简称为 PICKCa。

早在 70 年代，国际上就已发现了 PIC，双链聚肌胞具有很好的诱生干扰素作用，在此之后又发现了其衍生物，即含多聚赖氨酸和羧甲基纤维素的聚肌胞(PIC containing polyL-Lysin and Carboxymethylcellulose, PICLC)。但是 PIC 不能于灵长类以上的动物，包括人体，而 PICLC 的毒性太大也不能用于人体。于是人们继续研究，终于发现了 PICKCa，这种药品只是用于对某些病毒病的治疗。本领域技术人员熟知，感染和发病是完全不同的两个概念。PICKCa 的发现是用于病毒感染后，并且确诊患上病毒病时才使用。而且 PICKCa 对病毒病的治疗效果也不

尽人意。特别应当指出的是迄今为止没有任何资料报道将该已知的药品作为免疫佐剂来加以使用。

PICKCa 的用量是公知，因此通常每支疫苗中，可加入 1~2mg PICKCa，按不同疫苗的要求进行免疫注射。因此，本发明对 PICKCa 的用量不加以进一步的说明。

本发明涉及的佐剂 PICKCa 具有如下有益的效果：

1、PICKCa 同病毒抗原或灭活疫苗结合后能显著地提高该抗原或疫苗的免疫效果，即具有显著的免疫佐剂的作用。

2、由于 PICKCa 本身在人体上已经使用，使得 PICKCa 很容易被人们接受，并替代目前使用的铝佐剂而独树一帜，成为很有前途的新佐剂。

3、PICKCa 单独用于病毒性疾病感染的潜伏期具有显著的抗病毒效果。

4、PICKCa 与病毒抗原或灭活疫苗结合后，用于病毒病的治疗较单纯应用 PICKCa 又进一步增加了治疗效果。

由于免疫佐剂的非特异性，PICKCa 将在病毒、细菌、寄生虫感染治疗和抗肿瘤中产生重要作用，特别是将对多种疫苗产生显著的免疫佐剂作用。本文所涉及的疫苗包括人用狂犬病疫苗，流行性出血热疫苗，但不限制于此。

图表说明：

表 1：PICKCa 诱生干扰素的测定。

表 2：PICKCa 诱生白细胞介素 II 的测定。

表 3：用 PICKCa 来诱生小鼠体内 IgG 和中和抗体的测定。

表 4：PICKCa 降低感染狂犬病病毒小白鼠的死亡率。

表 5：PICKCa 与狂犬病毒抗原结合后，免疫 OF1 小鼠，在不同时间分离血清，检测其 IgM、IgG 中和抗体的结果。

表 6，表 7：PICKCa 促进疫苗效价的结果。

表 8：说明 PICKCa 与狂犬病毒抗原结合后，进一步降低感染狂犬病毒小鼠死亡率的结果。

表 9：对于 PICKCa 和疫苗结合后的安全性的检测。

表 10：显示 PICKCa 促进流行性出血热灭活疫苗抗体产生的情况。

为了进一步理解本发明，以下将结合实施例详细说明本发明的实质。下述

的实施例并非意在限定本发明，只是帮助人们理解本发明。

实验例 1

PICKCa 诱生干扰素

取 OF1 小鼠 20 只肌注 PICKCa, 每只 0.05~0.1mg。在不同时间分离小鼠血清，通过抑制 VSV 病毒在 L929 细胞产生的病变，然后通过显色法测定血清干扰素的产生情况。测定方法见 Mossman T., Rapid Colormetric Assay for Cellular Growth And Survival: Application to Proliferation And Cytotoxicity Assays, *J. Immun. Meth.* 1983, 65: 55-63。

该试验的结果见表 1。

该试验结果表明 PICKCa 能诱生高滴度干扰素，并在注射 2 小时即可达到高峰。

实验例 2

PICKCa 诱生白细胞介素 II (IL-2) 及其测定

取 C₃H 小鼠，用抗原，即灭活提纯狂犬病毒(IPRV)和 PICKCa 免疫小鼠。每只腹腔注射 0.1ml。取小鼠脾脏，用 ³H 标记 CTLL 细胞法测定 IL-2。该方法见 Joffret M. L., et al, Appraisal of Rabies Vaccine Potency by Determination of *in vitro*, Specific Interleukin-2 Production, *Biologicals*, 1991, 19(2): 113-123。

该试验的结果见表 2。表明 PICKCa 能够非特异性地提高 IL-2 产量。

实验例 3

A/J 小鼠用活的狂犬病毒野毒株 RD 9147 感染后，用 PICKCa 治疗，用 ELISA 法(Perrin P. T., Techniques for the Preparation of Rabies Conjugates in Laboratory Techniques in Rabies (4th,edition) WHO) 或 RFFIT 方法(Smith J., A Rapid Reproducible Test for Determining Rabies Neutralizing Antibody, *Bull. Wld hth Org.* 1973, 48:535-541)测定小鼠体内狂犬病毒 IgG 和中和抗体的滴度。每只小鼠体内狂犬病毒株 0.1ml，然后在 5 小时，3 天和 7 天各肌注 PICKCa 0.05ml/只，并于不同时间抽血检测 IgG 和中和抗体的滴度，其结果见表 3。

结果表明：小鼠在受到 RD 9147 感染后，用 PICKCa 治疗其 IgG 和中和抗体的滴度大大降低。表明由于 PICKCa 显著抑制了病毒的繁殖，而使之不能刺激机体产生抗体。

实验例 4

PICKCa 降低感染狂犬病小白鼠的死亡率

将 40 只 OF1 小鼠随机分成 4 组，每组 10 只，用狂犬病野毒株 RD 4077 感染小鼠，每只 0.1ml 感染后的 6 小时，第 3, 7, 14 和 18 天用 PICKCa 治疗，每只 0.05ml，肌注，观察小鼠的死亡率。其结果见表 4。

该结果说明 PICKCa 在狂犬病毒感染的潜伏期，能够极其显著地降低小白鼠的死亡率。

实验例 5

PICKCa 同狂犬病毒疫苗结合后的安全性测定

选用 2 组狂犬病毒疫苗分别加入 PICKCa，分别对小鼠进行脑内和腹腔注射，观察其死亡情况。

结果（见表 9）表明安全。本试验按“中国药典”急性毒性试验测量方法进行。

实施例 1

OF1 小鼠 46 只随机分成 4 组。本试验是 PICKCa 与狂犬病毒抗原结合后，即制成疫苗，免疫 OF1 小鼠，以该抗原组和抗原加铝佐剂组以及空白为对照，在不同的时间分离小鼠血清，检测 IgM, IgG 和中和抗体，其结果是表 5。

本试验中 IgG 和中和抗体的测定方法同实验例 3 中所用的方法相同，IgM 的测定用 ELISA 法。

该结果显示抗原 + PICKCa 组能刺激机体提前和提高产生 IgM, IgG，特别是中和抗体，而铝佐剂却使抗体产生滞后，说明以 PICKCa 为佐剂，其效果大大地高于 Al_2O_3 的佐剂效果。

实施例 2, 3

PICKCa 促进疫苗的效价

如表 6 所示, 用 NIH 法 WHO Laboratory Techniques in Rabies (3rd edition) 1973 检测, PICKCa 可降低使用半数有效抗原量(ED_{50})5-10 倍, 而铝佐剂仅降低 1-2 倍。

如表 7 表示, 用 NIH 法测定 PICKCa 对人用狂犬疫苗的佐剂效果。表明 PICKCa 可显著提高人用狂犬疫苗的效力 (国际单位), 使之均可从不合格而达到国际标准以上 (2.5 国际单位)。

实施例 4

PICKCa 与狂犬病毒抗原结合后, 肌注小白鼠, 又进一步降低了感染狂犬病毒的小白鼠的死亡率。

本试验的目的是当小鼠用野毒株感染后观察 PICKCa 或 Al_2O_3 同灭活提纯狂犬病毒结合后, 对小鼠的保护作用。

如表 8 所示 PICKCa 与狂犬病疫苗结合后治疗感染了狂犬病野毒株的小白鼠, 较单纯用 PICKCa 治疗, 又进一步降低了小白鼠的死亡率, 单纯灭活疫苗治疗效果微乎其微, 而加入铝佐剂则完全不起作用。

实施例 5

PICKCa 促进流行性出血热灭活疫苗抗体的产生

本试验采用 $Al(OH)_3$ 作对照。PICKCa 与出血热灭活疫苗等量混合后, 肌注实验家兔, 1ml/只, 隔周一次, 在第 14 和 21 天抽血, 用 ELISA 和 RPHI 检测抗体产生情况。

其结果见表 10。表明 PICKCa 促进流行性出血热疫苗 ELISA 抗体效价 4-8 倍, RPHI 抗体 2 倍, 而铝佐剂仅分别为 0~4 倍, 对 RPHI 抗体反而降低。

表 1 PICKCa 诱导小鼠干扰素的测定

时间(小时)	注射后干扰素滴度(国际单位×10 ⁻³)	
	PICKCa	
0	<5	
1	<5	
2	320	
3	24	
4	5	
6	<5	

表 2 用 PICKCa 和灭活提纯狂犬病毒(IPRV)免疫小鼠诱生白细胞介素-II 的测定

免疫	PICKCa 注射(μg)	体外刺激 IL-2 的测定(cpm×10 ⁻³)		
		培养液	IPRV	PICKCa
PBS*	0	1.1	1.1	0.9
PBS	75	0.5	0.6	0.9
IPRV	0	0.6	13.9	2.7
IPRV	75	3.7	15.7	2.0
		(0)**	(12.0)**	

*PBS: 磷酸盐缓冲液

**: 与培养液 IL-2 的差值

表 3: 用 ELISA 或 RFFIT 法测定 RD 9147 狂犬病野毒株感染后, 并且用 PICKCa 处理后 A/J 小鼠体内狂犬病 IgG 和中和抗体的滴度

不同日期 感染鼠的血清	感染后 PICKCa 治疗时间	ELISA 测 IgG 的 滴度(MIU/ml)	RFFIT 测中和抗体 的滴度(IU/ml)
RD 9147 3 天	/	/	0.28
RD 9147 3 天	第 7 小时	/	< 0.28
RD 9147 8 天	/	2528	1.60
RD 9147 8 天	第 5 小时, 第 3 天 和 7 天	< 224	< 0.25
RD 9147 15 天	/	11520	3.38
RD 9147 15 天	第 3 小时, 第 3, 7, 10, 14 天	3120	< 0.28
PBS 15 天	/	68	< 0.28

表明 PICKCa 显著抑制了狂犬病毒在小鼠体内的繁殖。

00 01.31

表 4 PICKCa 降低用 RD 4077 狂犬病野毒株感染的 OF1 小鼠死亡率

组	RD4077 稀释度	死亡率	潜伏期(天)
PICKCa	纯	4/10	17,18,20,22
	10 ⁻¹	0/10	
对照组	纯	10/10	10,11,12,13,14,13,13,17,17,17
	10 ⁻¹	10/10	11,13,14,14,17,17,17,19,

表 5 用狂犬病毒抗原(V427)或同该抗原结合的 PICKCa 或者 Al₂O₃ 免疫 OF1 小鼠, 测定其狂犬病 IgM, IgG 和中和抗体的滴度

免疫血清	IgM 滴度 ELISA 法 AU/ml	IgG 滴度 ELISA 法 MIU/ml	中和抗体滴度 RFFIT 法 IU/ml
第 4 天			
Ag	180	87	0.25
Ag+PICKCa	413	264	1.01
Ag+Al ₂ O ₃	231	97	< 0.13
第 7 天			
Ag	615	1522	1.01
Ag+PICKCa	> 1600	4166	6.65
Ag+Al ₂ O ₃	169	351	0.43
第 14 天			
Ag	479	4900	2.54
Ag+PICKCa	522	26320	17.24
Ag+Al ₂ O ₃	408	12000	11.97
第 30 天			
Ag	107	1800	3.01
Ag+PICKCa	150	13600	15.63
Ag+Al ₂ O ₃	190	4000	6.86
第 60 天			
Ag	117	5000	2.10
Ag+PICKCa	150	18800	15.96
Ag+Al ₂ O ₃	98	6000	7.64
空白对照	16	40	-

表 6 NIH 试验测定注射 PICKCa 或 Al₂O₃ 后的小鼠对灭活狂犬病毒的保护作用

佐剂	注射剂量(μg)	注射日期	半数有效量
无	0	7	
	0	0	221
	100	100	22
PICKCa	800	800	40
	3000	3000	93
Al ₂ O ₃	1000	1000	132

00 01.33

表 7 NIH 试验测定 PICKCa 对人用狂犬病疫苗的激刺效价

编号	试验组	ED50	效价	CVS LD50
疫苗 81163+PICKCa				
	4℃下 4 周	2.18	4.33 IU/2ml	5
	37℃下 4 周	1.96	2.64 IU/2ml	5
1 疫苗 89163				
	4℃下 4 周	1.80	1.82 IU/2ml	5
	37℃下 4 周	1.71	1.48 IU/2ml	5
	参照品 84-5	2.53	4.9 IU/安瓿	5
疫苗 890842+PICKCa				
	4℃下 4 周	1.99	4.58 IU/2ml	5
	37℃下 4 周	1.74	2.60 IU/2ml	5
2 疫苗 890842				
	4℃下 4 周	1.53	1.58 IU/2ml	5
	参照品 84-5	2.32	4.9 IU/安瓿	5
	参照品 84-5+PICKCa	2.49	14.1 IU/安瓿	32
	参照品 84-5	2.03	4.9 IU/安瓿	32

表 8 PICKCa, Al_2O_3 , 及其与狂犬病毒抗原结合后, 对感染狂犬病毒小鼠的治疗效果

其他治疗	用 IPRV 治疗后(注射量 μg)的死亡率		
	0	140	560
无	95(19/20)*	95(19/20)	20(7/10)
PICKCa	30(3/10)	95(19/20)	70(7/10)
Al_2O_3	100(10/10)	95(19/20)	70(7/10)

*: 小鼠死亡数 / 感染狂犬病毒小鼠数

表 9 狂犬病疫苗与 PICKCa 结合后对 18 克体重小白鼠的安全性测定

实验组数	组别	0.03 ml i.c	0.5 ml i.p
1	疫苗 89163+PICKCa	存活率 2/2	存活率 5/5
2	疫苗 89163+PICKCa	存活率 2/2	存活率 5/5

00 01.33

表 10 在家兔体内测定 PICKCa 或铝佐剂对流行性出血热疫苗产生的抗体的影响

兔号	免疫组别	14天血清		21天血清	
		ELISA	RPHI	ELISA	RPHI
1	疫苗 + Al(OH) ₃ + PICKCa	2048	/	2048	/
2	疫苗 + Al(OH) ₃ + PICKCa	2048	/	1024	/
3	疫苗 + PICKCa	4096	32	4096	32
4	疫苗 + PICKCa	4096	32	4096	32
5	疫苗 + Al(OH) ₃	1024	/	512	8
6	疫苗 + Al(OH) ₃	2048	/	1024	8
7	疫苗	512	16	512	16
8	疫苗	512	16	512	16

ELISA: 酶联免疫吸附测定

RPHI: 反应被动血凝抑制试验

表 1 PICACa 诱生小鼠干扰素的测定

时间 (小时) 注射后干扰素滴度 (国际单位 $\times 10^{-8}$)

	PICKCa
0	< 5
1	< 5
2	320
3	24
4	5
6	< 5

表 2 用PICKCa和灭活提纯狂犬病毒(IPRV) 免疫小鼠
诱生白细胞介素-2的测定

免疫 PICKCa注射 (μ g)	体外刺激 IL-2的测定			PICKCa
	培养液	IPRV	($\text{cpm} \times 10^{-8}$)	
PBS*	0	1. 1	1. 1	0. 9
PBS	75	0. 5	0. 6	0. 9
IPRV	0	0. 6	13. 9	2. 7
IPRV	75	3. 7	15. 7	2. 0
		(0) **	(12. 0) **	

* PBS: 磷酸盐酸缓冲液

**: 与培养液 IL-2的差值

表 3: 用ELISA或RFFIT法测定RD9147狂犬病
野毒株感染后, 并且PICKCa处理后A/J小鼠体内
狂犬病 IgG和中和抗体的滴度

不同日期 感染鼠的血清	感染后PICKCa 治疗时间	ELISA测 IgG的滴度 (MIU/ml)	RFFIT测中和 抗体的滴度 (IU/ml)
RD9147 3天	/	/	0. 28
RD9147 3天	第7小时	/	<0. 28
RD9147 8天	/	2528	1. 60
RD9147 8天	第5小时, 第3天和 7天	<224	<0. 25
RD9147 15天	/	11520	3. 38
RD9147 15天	第3小时, 第 3, 7, 10 14天	3120	<0. 28
PBS	15天	68	<0. 28

表明PICKCa显著抑制了狂犬病毒在小鼠体内的繁殖。

表 4 PICKCa降低用RD4077狂犬病野毒株感染的OF1小鼠死亡率

组	RD4077 稀释度	死亡率	潜伏期(天)
PICKCa	纯	4/10	17, 18, 20, 22
	10^{-1}	0/10	
对照组	纯	10/10	10, 11, 12, 13, 14, 13, 13, 17, 17, 17
	10^{-1}	10/10	11 13, 14, 14, 17, 17, 17, 19,

第30天

Ag	107	1800	3. 01
Ag+PICKCa	150	18600	15. 63
Ag+Al ₂ O ₃	190	4000	6. 86

第60天

Ag	117	5000	2. 10
Ag+PICKCa	150	18800	15. 96
Ag+Al ₂ O ₃	98	6000	7. 64

空白对照	16	40	-
------	----	----	---

表 6 用 NIH 试验测定注射 PICCKa 或 Al_2O_3 后的小鼠对灭活狂犬病毒的保护作用

佐剂	注射剂量 (μg)	注射日期	半数有效量
无	0	7	
PICCKa	0	0	221
	100	100	22
	800	800	40
Al_2O_3	3000	3000	93
	1000	1000	132

表 7 用 NIH 试验测定 PICCKa 对人用狂犬病疫苗的
激刺效价

编号	试验组	ED50	效价	CVS	LD50
疫苗 81163					
+PICCKa					
	4℃下4周	2. 18	4. 33 IU/2ml		5
1	37℃下4周	1. 96	2. 64 IU/2ml		5
疫苗 89163					
+PICCKa					
	4℃下4周	1. 80	1. 82 IU/2ml		5
	37℃下4周	1. 71	1. 48 IU/2ml		5
	参照品 84-5	2. 53	4. 9 IU/安瓶		5
疫苗 890842					
+PICCKa					
	4℃下4周	1. 99	4. 58 IU/2ml		5
2	37℃下4周	1. 74	2. 60 IU/2ml		5
疫苗 890842					
+PICCKa					
	4℃下4周	1. 53	1. 58 IU/2ml		5

参照品 84-5 2. 32 4. 9 IU/安瓶 5

参照品 84-5

+PICKCa 2. 49 14. 1 IU/安瓶 32

参照品 84-5 2. 03 4. 9 IU/安瓶 32

表 8 PICKCa, Al_2O_3 及其与狂犬病毒抗原结合后, 对感染狂犬病毒小鼠的治疗效果

用 IPRV 治疗后 (注射量 μ g) 的死亡率			
其它治疗	0	140	560
无	95 (19/20) *	95 (19/20)	20 (7/10)
PICKCa	30 (3/10)	95 (19/20)	70 (7/10)
Al_2O_3	100 (10/10)	95 (19/20)	70 (7/10)

* 小鼠死亡数/感染狂犬病毒小鼠数

表 9 狂犬病疫苗与PICKCa结合后对18克体重的小白鼠安全性测定

实验组数	组别	0.03 ml i. c	0.5 ml i. p
1	疫苗89163 +PICKCa	存活率2/2	存活率5/5
2	疫苗89163 +PICKCa	存活率2/2	存活率5/5

表 10 PICKCa或铝佐剂在家兔体内对流行性出血热疫苗抗体测定

兔号	免疫组别	14天血清		21天血清	
		ELISA	RPHI	ELISA	RPHI
1	疫苗 +Al(OH) ₃ +PICKCa	2048	/	2048	/
2	疫苗 +Al(OH) ₃ +PICKCa	2048	/	1024	/
3	疫苗 +PICKCa	4096	32	4096	32
4	疫苗 +PICKCa	4096	32	4096	32
5	疫苗 Al(OH) ₃	1024	/	512	8
6	疫苗 Al(OH) ₃	2048	/	1024	8
7	疫苗	512	16	512	16
8	疫苗	512	16	512	16

ELISA: 酶联免疫吸附测定

RPHI : 反应被动血凝抑制试验

表5 用狂犬病毒抗原(V427)或同该抗原结合的PICKCa或者Al₂O₃免疫OF1小鼠, 测定其狂犬病IgM, IgG和中和抗体的滴度

免疫血清	IgM滴度	IgG滴度	中和抗体滴度
	ELISA法 AU/ml	ELISA法 MIU/ml	RFFIT法 IU/ml
第4天			
Ag	180	87	0. 25
Ag+PICKCa	413	264	1. 01
Ag+Al ₂ O ₃	231	97	<0. 13
第7天			
Ag	615	1522	1. 01
Ag+PICKCa	>1600	4166	6. 65
Ag+Al ₂ O ₃	169	351	0. 43
第14天			
Ag	479	4900	2. 54
Ag+PICKa	522	26320	17. 24
Ag+Al ₂ O ₃	408	12000	11. 97